Thai Science and Technology Journal Vol. 34 No. 5 September–October 2026 ISSN 3027-6365 (Online)

Thai Science and Technology Journal
วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
Journal Homepage : http://li01.tci-thaijo.org/index.php/tstj

ผลของตัวทำละลายต่อการสกัดและการแยก Pinostrobin, Pinocembrin และ Panduratin A จากเหง้ากระชาย

Effects of Extraction Solvents on the Recovery and Isolation of Pinostrobin, Pinocembrin, and Panduratin A from *Boesenbergia rotunda* Rhizomes

อัมพร แซ่กี้[1,2], นภสร ชาบาง[3*]

[1]*ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร 10400*

[2]*ศูนย์ความเป็นเลิศด้านนวัตกรรมทางเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร 10400*

[3]*กลุ่มสาขาวิชาชีวนวัตกรรมและผลิตภัณฑ์ฐานชีวภาพอัจฉริยะ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร 10400*

Amporn Saekee[1,2], Napason Chabang[3*]

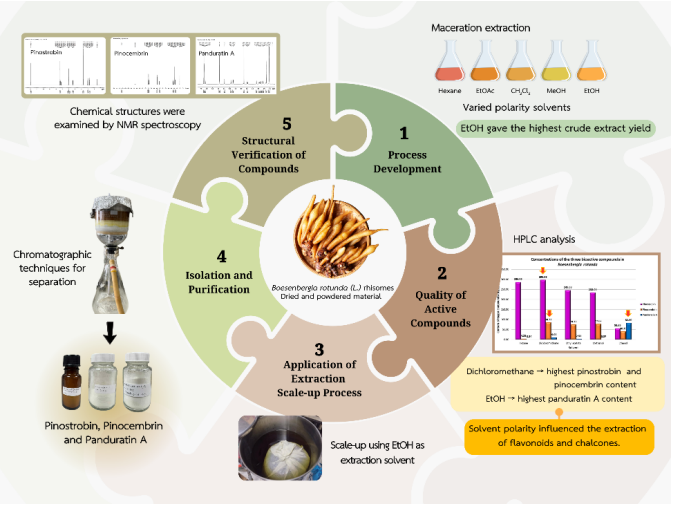
[1]*Department of Chemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, 10400, Thailand*

[2]*Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, 10400, Thailand*

[3]*School of Bioinnovation and Bio-based Product Intelligence, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, 10400, Thailand*

Received

GRAPHICAL ABSTRACT



ABSTRACT

Fingerroot (*Boesenbergia rotunda* L. Mansf.) is an important source of flavonoids and chalcones with potential applications in pharmaceuticals, nutraceuticals, and the quality control of herbal products. This study evaluated the effects of solvent polarity on extract yield and the contents of pinostrobin, pinocembrin, and panduratin A, as well as the feasibility of scaling up the extraction process and systematically isolating bioactive compounds. The results showed that ethanol produced the highest total extract yield, whereas dichloromethane exhibited the greatest selectivity for pinostrobin and pinocembrin, while ethanol showed the greatest selectivity for panduratin A. Ethanol was therefore selected for scale-up extraction. All three target compounds were subsequently isolated using column chromatography combined with crystallization, and their structures were confirmed by NMR spectroscopy. These findings demonstrate that solvent selection for fingerroot extraction should consider both total extract yield and selectivity for the target compounds. The knowledge gained bridges laboratory-scale solvent selection and scale-up extraction and purification, providing a foundation for developing an efficient target-oriented extraction process suitable for further applications.

คำสำคัญ

กระชาย; Pinostrobin; Pinocembrin; Panduratin A; การสกัดแบบมุ่งเป้า; การเลือกตัวทำละลาย

Keywords

Boesenbergia rotunda; Pinostrobin; Pinocembrin; Panduratin A; Target-oriented Extraction; Solvent selection

บทคัดย่อ

กระชาย (*Boesenbergia rotunda* L. Mansf.) เป็นแหล่งสำคัญของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์และชาลโคน ซึ่งมีศักยภาพต่อการประยุกต์ใช้ด้านเภสัชกรรม โภชนเภสัช และการควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์สมุนไพร การศึกษานี้ประเมินผลของความมีขั้วของตัวทำละลายต่อผลผลิตสารสกัดและปริมาณ pinostrobin, pinocembrin และ panduratin A ตลอดจนศึกษาความเป็นไปได้ของการขยายขนาดและการแยกสารสำคัญอย่างเป็นระบบ ผลการศึกษาพบว่าเอทานอลให้ผลผลิตสารสกัดรวมสูงที่สุด ขณะที่ ไดคลอโรมีเทนมีความเหมาะสมต่อ pinostrobin และ pinocembrin และเอทานอลมีความเหมาะสมต่อ panduratin A มากที่สุด จึงเลือกเอทานอลสำหรับการสกัดระดับขยายขนาด และสามารถแยกสารเป้าหมายทั้งสามชนิดได้ด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีร่วมกับการตกผลึก โดยยืนยันโครงสร้างด้วยเทคนิค NMR ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าการเลือกตัวทำละลายสำหรับกระชายควรพิจารณาควบคู่กันทั้งผลผลิตสารสกัดรวมและความเหมาะสมต่อสารเป้าหมาย องค์ความรู้ที่ได้ช่วยเชื่อมโยงการคัดเลือก ตัวทำละลายในระดับห้องปฏิบัติการกับการขยายขนาดและการทำบริสุทธิ์ และเป็นพื้นฐานสำหรับการพัฒนากระบวนการสกัดแบบมุ่งเป้าที่มีประสิทธิภาพและเหมาะต่อการประยุกต์ใช้ต่อไป

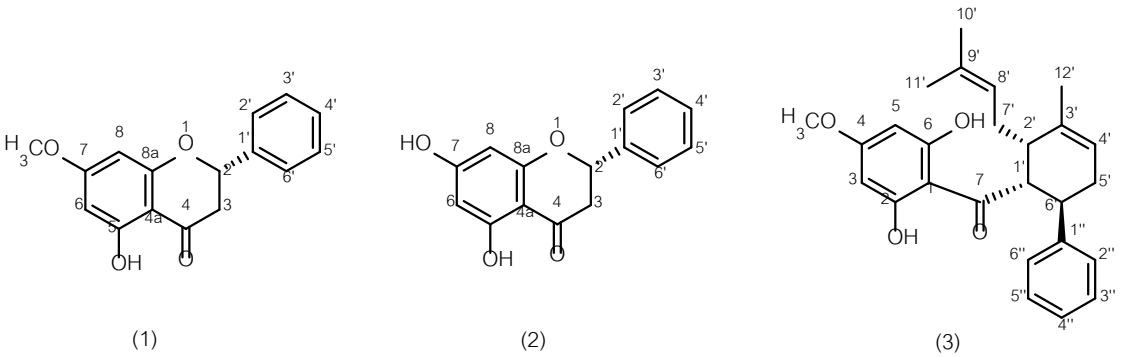
***ผู้รับผิดชอบบทความ:** napason.cha@mahidol.ac.th **DOI:**

1. บทนำ

ประเทศไทยมีความหลากหลายทางชีวภาพสูง และมีภูมิปัญญาการใช้สมุนไพรมายาวนาน สมุนไพรจึงมีบทบาทสำคัญต่อการดูแลสุขภาพและเศรษฐกิจ ทั้งในด้านการแพทย์พื้นบ้าน การปรุงอาหาร และการพัฒนาผลิตภัณฑ์เชิงพาณิชย์ งานวิจัยด้านสมุนไพรจึงมีความสำคัญต่อการเพิ่มมูลค่าทางเศรษฐกิจ ลดการพึ่งพายานำเข้า และเป็นแนวทางสู่การพัฒนายาสมัยใหม่ กระชาย (*Boesenbergia rotunda* L. Mansf.) เป็นสมุนไพรพื้นบ้านในวงศ์ Zingiberaceae ที่ใช้เป็นทั้งอาหารและยา มีการใช้ในตำรับยาไทยเพื่อรักษาอาการแน่นจุกเสียด ท้องอืด ท้องเฟ้อ ขับลม และบำรุงร่างกาย นอกจากนี้ยังมีบันทึกการใช้กระชายในตำรายาสมุนไพรเพื่อเสริมธาตุและแก้โรคต่างๆ จึงนับเป็นสมุนไพรเศรษฐกิจที่มีศักยภาพสูงในการวิจัยและพัฒนา [1]

จากการศึกษาพบว่ากระชาย เป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลากหลาย ครอบคลุมสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ เช่น pinostrobin, pinocembrin, alpinetin สารกลุ่มชาลโคน เช่น cardamonin, panduratin A, 4-hydroxypanduratin A อนุพันธ์พรีนิล เอสเทอร์ คาไวน์ และสารกลุ่มเทอร์พีนจากน้ำมันหอมระเหย [2] โดยพบว่าสารกลุ่มฟลาโวนอยด์หลักที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพสูงในกระชาย ได้แก่ pinostrobin และ pinocembrin สารกลุ่มชาลโคนที่มีฤทธิ์ต้านไวรัสและต้านการอักเสบ ได้แก่ panduratin A ซึ่งสารทั้งสามชนิดจัดเป็นสารทุติยภูมิ (secondary metabolites) ที่มีความสำคัญต่อการพัฒนาผลิตภัณฑ์สมุนไพรที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ งานวิจัยหลายชิ้นยืนยันว่าสาร pinostrobin, pinocembrin และ panduratin A มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญ ได้แก่ ฤทธิ์ต้านไวรัส SARS-CoV-2 [3] ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ลดความเสียหายจากภาวะเครียดออกซิเดชัน [4-6] ฤทธิ์ต้านการอักเสบ โดยลดการตอบสนองของกระบวนการอักเสบในระดับเซลล์ [7] และฤทธิ์ส่งเสริมการฟื้นฟูเซลล์ผิวหนังและการสมานแผล [8-9] ทั้งนี้งานวิจัยก่อนหน้าได้ประยุกต์ใช้เทคนิคเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดจากกระชายขาวในหลากหลายรูปแบบ เช่น centrifugal partition chromatography [10] รวมถึงแนวทาง supercritical CO_2 extraction ที่ศึกษาผลของตัวแปรกระบวนการและการเติมเอทานอลเป็น co-solvent โดยเปรียบเทียบกับการสกัดเอทานอลแบบดั้งเดิม [11] และการสกัดแบบ pulse electric field (PEF) assisted extraction เพื่อเพิ่มการปลดปล่อยสารจากเนื้อเยื่อพืชและเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดสารเป้าหมาย สำหรับพัฒนากระบวนการสกัดและแยกสารแบบมุ่งเป้า (target-oriented extraction) ที่เชื่อมโยงการเลือกตัวทำละลายและสภาวะการสกัดกับสารเป้าหมาย [12] ประสิทธิภาพการสกัดสารสำคัญจากพืชขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย โดยชนิดและความมีขั้วของตัวทำละลายเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อทั้งปริมาณสารสกัดรวมและความเหมาะสมต่อสารเป้าหมาย ตัวทำละลายแต่ละชนิดอาจให้ผลผลิตสารสกัดแตกต่างกัน และตัวทำละลายที่ให้ผลผลิตรวมสูงอาจไม่ให้ปริมาณสารเป้าหมายสูงที่สุด ดังนั้น การเปรียบเทียบตัวทำละลายภายใต้เงื่อนไขเดียวกันจึงมีความจำเป็นต่อการคัดเลือกสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสกัดแบบมุ่งเป้า แม้ว่าจะมีรายงานเกี่ยวกับการสกัดและการแยกสารสำคัญจากกระชายหลายวิธี แต่ข้อมูลที่เชื่อมโยงการคัดเลือกตัวทำละลายกับการขยายขนาดและการแยก pinostrobin, pinocembrin และ panduratin A ในกระบวนการเดียวกันยังมีจำกัด การศึกษาดังกล่าวจึงมีความสำคัญต่อการพัฒนากระบวนการที่สามารถเลือกตัวทำละลายได้เหมาะสมกับสารเป้าหมาย ลดความสูญเสียระหว่างการแยก และสนับสนุนการนำกระบวนการไปประยุกต์ใช้ในระดับที่สูงขึ้น

ดังนั้น การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบผลของตัวทำละลายที่มีความมีขั้วแตกต่างกันต่อผลผลิตสารสกัดและปริมาณ pinostrobin, pinocembrin และ panduratin A (Figure 1) จากเหง้ากระชาย ตลอดจนคัดเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับการขยายขนาดและการแยกสารเป้าหมายอย่าง



(1) (2) (3)

Figure 1 Structures of pinostrobin (1), pinocembrin (2) and panduratin A (3)

เป็นระบบ ผลการศึกษานี้จะช่วยอธิบายความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของ ตัวทำละลายกับประสิทธิภาพในการสกัดสารเป้าหมาย และเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการพัฒนากระบวนการสกัดและแยกสารสำคัญจากกระชายให้มีประสิทธิภาพและเหมาะสมต่อการประยุกต์ใช้ในระดับที่สูงขึ้น

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 วัตถุดิบพืชและการเตรียมตัวอย่าง

2.1.1 วัตถุดิบพืช

เหง้ากระชาย (*Boesenbergia rotunda* L. Mansf.) อายุเก็บเกี่ยว 8 เดือน จัดซื้อจากผู้จำหน่ายในจังหวัดปทุมธานี ประเทศไทย ในเดือนตุลาคม พ.ศ. 2567 และตรวจสอบเอกลักษณ์ทางพฤกษศาสตร์โดยผู้เชี่ยวชาญ เก็บรักษาไว้ ณ ศูนย์ความเป็นเลิศด้านการค้นหาตัวยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล การระบุชนิดและข้อกำหนดคุณภาพของวัตถุดิบอ้างอิงตามตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย พ.ศ. 2561 [1]

2.1.2 การเตรียมตัวอย่าง

เหง้ากระชายน้ำหนัก 1 กิโลกรัมถูกล้าง หั่นเป็นชิ้น และทำให้แห้งที่อุณหภูมิ 45-50°C จนมีน้ำหนักคงที่ตามวิธีที่ระบุในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย [1] ตัวอย่างแห้งน้ำหนัก 270 กรัมถูกบดเป็นผง บรรจุในภาชนะปิดสนิท และเก็บรักษาที่ 4°C จนกระทั่งนำไปสกัด

2.2 การสกัดด้วยตัวทำละลาย

การสกัดด้วยวิธีการหมักแช่ เป็นแนวทางที่เลือกใช้ในการพัฒนากระบวนการสกัดในครั้งนี้ เนื่องจากเป็นวิธีที่มีขั้นตอนไม่ซับซ้อน สามารถประยุกต์ใช้ได้ง่าย และเหมาะสมต่อการประเมินคุณภาพของสารสกัดเบื้องต้น โดยนำผงเหง้ากระชายแห้ง 5 กรัม ถูกสกัดด้วยวิธีหมักแช่โดยใช้ตัวทำละลาย 5 ชนิด ได้แก่ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน เอทิลอะซิเตท เมทานอล และเอทานอล ปริมาตร 40 มิลลิลิตรต่อชนิด (AR grade; RCI Labscan, Thailand) ภายใต้ภาชนะปิดเป็นเวลา 3 วัน สารสกัดถูกกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman™ No. 1 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 55 มิลลิเมตร และระเหยตัวทำละลายภายใต้ความดันด้วยเครื่องระเหยสารแบบหมุนจนได้สารสกัดหยาบ ดังแสดงใน Figure 2 การทดลองแต่ละสภาวะดำเนินการอย่างอิสระจำนวน 3 ซ้ำ

2.3 การวิเคราะห์สารสำคัญด้วย HPLC

วิเคราะห์ปริมาณ pinostrobin, pinocembrin และ panduratin A ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงแบบวัฏภาคย้อนกลับ โดยเตรียมสารมาตรฐานที่ความเข้มข้น 1, 5, 10, 50, 100, 200 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเตรียมสารละลาย

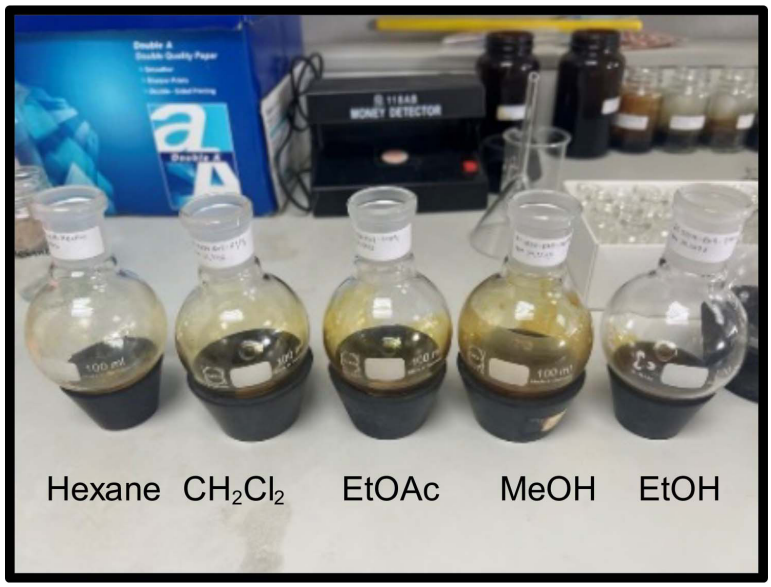


Figure 2 Dried extracts obtained using the five different solvents

ตัวอย่างที่ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในอะซีโตไนไตรล์เกรด HPLC (Merck, Germany) ก่อนกรองผ่านตัวกรองไนลอนขนาด 0.45 ไมโครเมตร การวิเคราะห์ดำเนินการด้วยเครื่อง Waters Alliance e2695 พร้อมตัวตรวจวัดยูวีและคอลัมน์ Agilent Poroshell HPH-C18 ขนาด 4.6 × 100 มิลลิเมตร อนุภาค 2.7 ไมโครเมตร วัฏภาคเคลื่อนที่ประกอบด้วย สารละลายกรดฟอสฟอริก 0.1% ในน้ำเป็นตัวทำละลาย A และอะซีโตไนไตรล์เป็นตัวทำละลาย B ใช้อัตราการไหล 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาตรฉีด 2 ไมโครลิตร และตรวจวัดที่ 290 นาโนเมตร โปรแกรมไล่ระดับเริ่มที่ 90% A และ 10% B ปรับเป็น 100% B ภายใน 3 นาที คงไว้จนถึงนาทีที่ 9 จากนั้นกลับสู่สภาวะเริ่มต้นที่นาทีที่ 12 และปรับสมดุลคอลัมน์จนถึงนาทีที่ 15 ระบุชนิดของสารโดยเปรียบเทียบเวลาเก็บกักกับสารมาตรฐาน และคำนวณปริมาณจากสมการเส้นสอบเทียบระหว่างความเข้มข้นกับพื้นที่ใต้พีก

2.4 การขยายขนาดสารสกัด

เอทานอลถูกเลือกเป็นตัวทำละลายสำหรับการสกัดระดับขยายขนาด เนื่องจากให้ผลผลิตสารสกัดรวมและปริมาณ panduratin A สูงที่สุดภายใต้เงื่อนไขที่ศึกษา อีกทั้งยังใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับการศึกษาวิจัยในระยะต่อไป ผงเหง้ากระชายแห้ง 5 กิโลกรัมถูกบรรจุในถุงผ้าและหมักแช่ด้วยเอทานอล 40 ลิตร โดยใช้อัตราส่วน ระยะเวลา และอุณหภูมิเดียวกับการสกัดระดับห้องปฏิบัติการ ดังแสดงใน Figure 3 สารสกัดถูกกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman™ No. 1 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 32 เซนติเมตร และระเหยตัวทำละลายภายใต้ความดันจนได้สารสกัดหยาบสำหรับการแยกสารสำคัญต่อไป



Figure 3 Schematic representation of the maceration extraction procedure during the extraction scale-up process

2.5 การแยกและทำบริสุทธิ์สาร

2.5.1 การแยกเบื้องต้นด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบใช้สูญญากาศ

สารสกัดเอทานอลหยาบถูกตกผลึกด้วยเอทานอลเพื่อแยก pinostrobin เบื้องต้น ส่วนสารสกัดที่เหลือถูกแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบใช้สูญญากาศบนซิลิกาเจล (No. 7747, Merck, Germany) โดยบรรจุในกรวยแก้วกรองชนิด sintered glass และชะด้วยระบบตัวทำละลายแบบไล่ระดับ เริ่มจากเอทิลอะซิเตทในเฮกเซนที่ความเข้มข้น 2, 6, 8, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 70 และ 100% (v/v) ตามด้วยเมทานอลในเอทิลอะซิเตทที่ความเข้มข้น 5, 20, 50 และ 100% (v/v) โดยใช้ตัวทำละลาย 500 มิลลิลิตรต่อระดับความเข้มข้น และเก็บส่วนแยกย่อยทุก 500 มิลลิลิตร ส่วนแยกย่อยถูกตรวจติดตามด้วยโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง (TLC; TLA-R10011B-323, 20 × 20 เซนติเมตร, Silicycle, Canada) โดยเปรียบเทียบรูปแบบแถบสารกับสารมาตรฐาน pinostrobin, pinocembrin และ panduratin A ภายใต้แสงยูวีที่ 254 นาโนเมตร ส่วนแยกย่อยที่มีรูปแบบแถบสารใกล้เคียงกันถูกรวมเป็นส่วน A_1-A_5 และระเหยตัวทำละลายภายใต้ความดันจนแห้ง

2.5.2 การแยกส่วนย่อยด้วยคอลัมน์ซิลิกาเจล

ส่วนแยกย่อย A_3 ถูกแยกต่อด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบเปียกบนซิลิกาเจล (No. 7734, Merck, Germany) โดยชะด้วยเอทิลอะซิเตท 20% ในเฮกเซน และตรวจติดตามด้วย TLC ส่วนแยกย่อยที่มีรูปแบบแถบสารใกล้เคียงกันถูกรวมเป็นส่วนแยกย่อย B_1–B_7

ส่วนแยกย่อย B_3 ถูกแยกซ้ำด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบเปียกบนซิลิกาเจลชนิดเดียวกัน โดยชะด้วยเมทานอล 1% ในไดคลอโรมีเทน และรวมส่วนแยกย่อยตามผล TLC เป็นส่วนแยกย่อย C_1–C_3

2.5.3 การแยกด้วย Sephadex LH-20 และการตกผลึก

ส่วนแยกย่อย C_2 ถูกแยกต่อด้วยคอลัมน์ Sephadex LH-20 โดยใช้ไดคลอโรมีเทนเป็นตัวชะ และตรวจติดตามด้วย TLC ก่อนรวมเป็นส่วนแยกย่อย D_1–D_4 ส่วนที่มีสารเป้าหมายถูกทำให้บริสุทธิ์ขั้นสุดท้ายด้วยการตกผลึก โดยใช้เอทานอลสำหรับ panduratin A และเมทานอล–ไดคลอโรมีเทนสำหรับ pinocembrin ส่วน pinostrobin ถูกทำให้บริสุทธิ์ด้วยการตกผลึกจากเอทานอล สารที่ได้ถูกทำให้แห้ง ชั่งน้ำหนัก และนำไปยืนยันเอกลักษณ์ทางโครงสร้างด้วย NMR

2.6 การยืนยันโครงสร้างด้วย NMR

ยืนยันเอกลักษณ์ทางโครงสร้างของสารที่แยกได้ด้วยสเปกโตรสโกปีเรโซแนนซ์แม่เหล็กนิวเคลียร์ (NMR spectroscopy) โดยใช้เครื่อง Bruker AscendTM 400 บันทึกสเปกตรา ^{1}H NMR และ ^{13}C NMR ของ pinostrobin และ panduratin A ที่ละลายในสารละลายคลอโรฟอร์ม-ดี (chloroform-D; $CDCl_3$) และใช้เตตระเมทิลไซเลน (TMS) เป็นสารอ้างอิงมาตรฐาน และ pinocembrin ที่ละลายในสารละลายอะซิโตน-ดีหก (Acetone-d_6)

2.7 การวิเคราะห์ทางสถิติ

การทดลองดำเนินการอย่างอิสระจำนวน 3 ซ้ำ สำหรับตัวทำละลายแต่ละชนิด โดยแต่ละซ้ำเริ่มจากการชั่งตัวอย่างพืช การสกัด การทำให้เข้มข้น และการเตรียมสารละลายสำหรับวิเคราะห์แยกจากกัน ผลการทดลองรายงานเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน วิเคราะห์ความแตกต่างของผลผลิตสารสกัดและปริมาณ pinostrobin, pinocembrin และ panduratin A ระหว่างตัวทำละลายแต่ละชนิดด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (one-way analysis of variance; one-way ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยรายคู่ด้วยวิธี Tukey's multiple comparison test โดยกำหนดระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ $p<0.05$

3. ผลการวิจัย

3.1 ปริมาณผลผลิตของสารสกัด

การสกัดเหง้ากระชายด้วยวิธีหมักแช่โดยใช้ตัวทำละลายต่างชนิดให้ผลผลิตสารสกัดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ดังแสดงใน Figure 4 โดยเอทานอลให้ผลผลิตสูงที่สุด 0.59 ± 0.01 กรัม หรือร้อยละ 11.81 รองลงมาได้แก่ เอทิลอะซิเตท 0.52 ± 0.02 กรัม หรือร้อยละ 10.41 ไดคลอโรมีเทน 0.47 ± 0.01 กรัม หรือร้อยละ 9.43 และเมทานอล 0.45 ± 0.02 กรัม หรือร้อยละ 9.02 ขณะที่เฮกเซนให้ผลผลิตต่ำที่สุด 0.25 ± 0.01 กรัม หรือร้อยละ 5.03 ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรต่างกันแสดงว่าผลผลิตสารสกัดจากตัวทำละลายทั้งห้าชนิดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ $p<0.05$

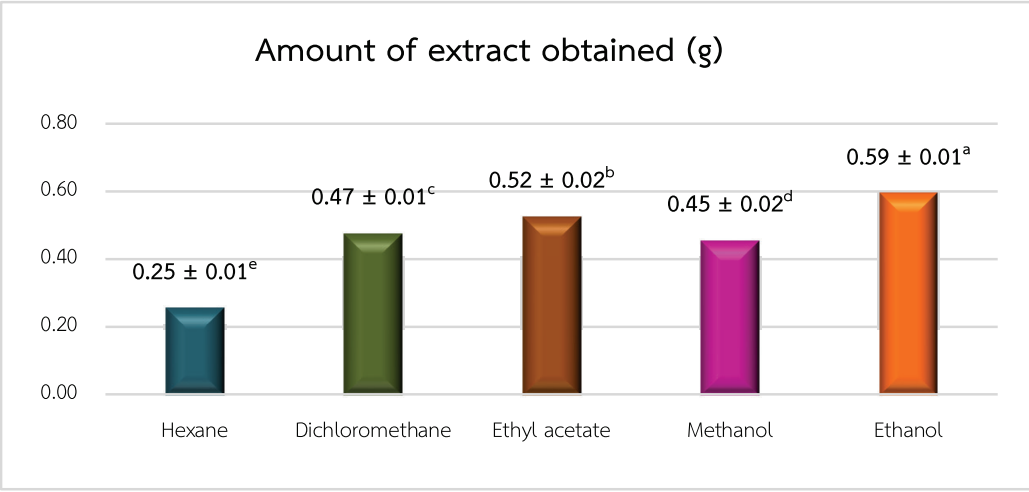


Figure 4 Extract yields obtained from extractions using different solvents. Values are expressed as mean ± SD (n=3). Different superscript letters indicate significant differences among solvents (p<0.05).

แนวโน้มใน Figure 4 แสดงให้เห็นว่าตัวทำละลายที่มีขั้วปานกลางถึงสูง โดยเฉพาะเอทานอลและเอทิลอะซิเตท สามารถสกัดองค์ประกอบรวมจากเหง้ากระชายได้มากกว่าเฮกเซนซึ่งเป็นตัวทำละลายไม่มีขั้ว สะท้อนว่าความมีขั้วและความสามารถในการละลายองค์ประกอบทางเคมีของตัวทำละลายมีผลต่อผลผลิตสารสกัด อย่างไรก็ตาม ผลผลิตสารสกัดรวมเป็นเพียงเกณฑ์เบื้องต้น และควรพิจารณาร่วมกับปริมาณสารเป้าหมายแต่ละชนิดก่อนคัดเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับการศึกษาขั้นต่อไป

3.2 ปริมาณสารสำคัญ

จากการวิเคราะห์ปริมาณ pinostrobin, pinocembrin และ panduratin A ในสารสกัดกระชายด้วยเทคนิค HPLC (Figure 5-7) พบว่าชนิดของตัวทำละลายมีผลต่อปริมาณสารสำคัญทั้งสามชนิดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงใน Table 1 โดยพบว่าไดคลอโรมีเทนให้ปริมาณ pinostrobin และ pinocembrin สูงที่สุด เท่ากับ 296.88 ± 0.06 และ 84.72 ± 0.03 มิลลิกรัมต่อกรัมสารสกัด ตามลำดับ ขณะที่เอทานอลให้ปริมาณ panduratin A สูงที่สุด เท่ากับ 82.49 ± 0.03 มิลลิกรัมต่อกรัมสารสกัด ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรต่างกันภายในคอลัมน์เดียวกันแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ $p<0.05$

ข้อมูลใน Table 1 แสดงให้เห็นว่าตัวทำละลายแต่ละชนิดมีความเหมาะสมต่อสารเป้าหมายแตกต่างกัน โดยไดคลอโรมีเทนให้ปริมาณ pinostrobin และ pinocembrin สูงที่สุด เท่ากับ 29.69 และ 8.47% โดยน้ำหนัก ตามลำดับ ขณะที่สารสกัดเอทานอลให้ panduratin A สูงที่สุด เท่ากับ 8.25% โดยน้ำหนัก ผลดังกล่าวสะท้อนว่าประสิทธิภาพการสกัดไม่ได้ขึ้นอยู่กับผลผลิตสารสกัดรวมเพียงอย่างเดียว แต่ยังสัมพันธ์กับความมีขั้ว โครงสร้างทางเคมี และความสามารถในการละลายของสารแต่ละชนิดในตัวทำละลาย เมื่อเปรียบเทียบกับรายงานของ Polsan et al. [13] ซึ่งพบ pinostrobin และ pinocembrin 12.0 และ 6.0% โดยน้ำหนักในสารสกัด เอทานอล และ Techapichetvanich et al. [14] ที่พบ panduratin A 5.68% โดยน้ำหนักในสารสกัดมาตรฐานที่เตรียมด้วยเอทานอล 95% ซึ่งสนับสนุนว่าชนิดของตัวทำละลายและสภาวะการสกัดมีผลต่อความเข้มข้นของสารเป้าหมาย สอดคล้องกับ

Table 1 Contents of target compounds in *Boesenbergia rotunda* extracts obtained using different solvents

Extract	Content of target compounds (mg/g extract)		
	Pinostrobin	Pinocembrin	Panduratin A
Hexane	286.36 ± 0.06^{b}	4.28 ± 0.01^{e}	0.34 ± 0.01^{e}
Dichloromethane	296.88 ± 0.06^{a}	84.72 ± 0.03^{a}	9.98 ± 0.01^{b}
Ethyl acetate	245.63 ± 0.05^{c}	74.37 ± 0.02^{c}	2.53 ± 0.01^{c}
Methanol	233.93 ± 0.02^{d}	77.67 ± 0.02^{b}	0.57 ± 0.01^{d}
Ethanol	55.65 ± 0.01^{e}	40.30 ± 0.01^{d}	82.49 ± 0.03^{a}

Data are presented as mean ± standard deviation (SD), n = 3

Mean values followed by different superscripts within a column are significantly different ($p < 0.05$)

Eiamart et al. [10] ที่รายงานผลของตัวทำละลายต่อการสกัด pinostrobin และ panduratin A จากกระชาย ดังนั้น การเลือกตัวทำละลายควรพิจารณาทั้งผลผลิตสารสกัดและความเหมาะสมต่อสารเป้าหมายให้สอดคล้องกับวัตถุประสงค์ของกระบวนการสกัด

3.3 การขยายขนาดกระบวนการแยกสารสำคัญ

เอทานอลถูกเลือกสำหรับการสกัดระดับขยายขนาด เนื่องจากให้ผลผลิตสารสกัดรวมและปริมาณ panduratin A สูงที่สุดภายใต้เงื่อนไขที่ศึกษา อีกทั้ง panduratin A เป็นสารเป้าหมายที่มีรายงานฤทธิ์ยับยั้ง

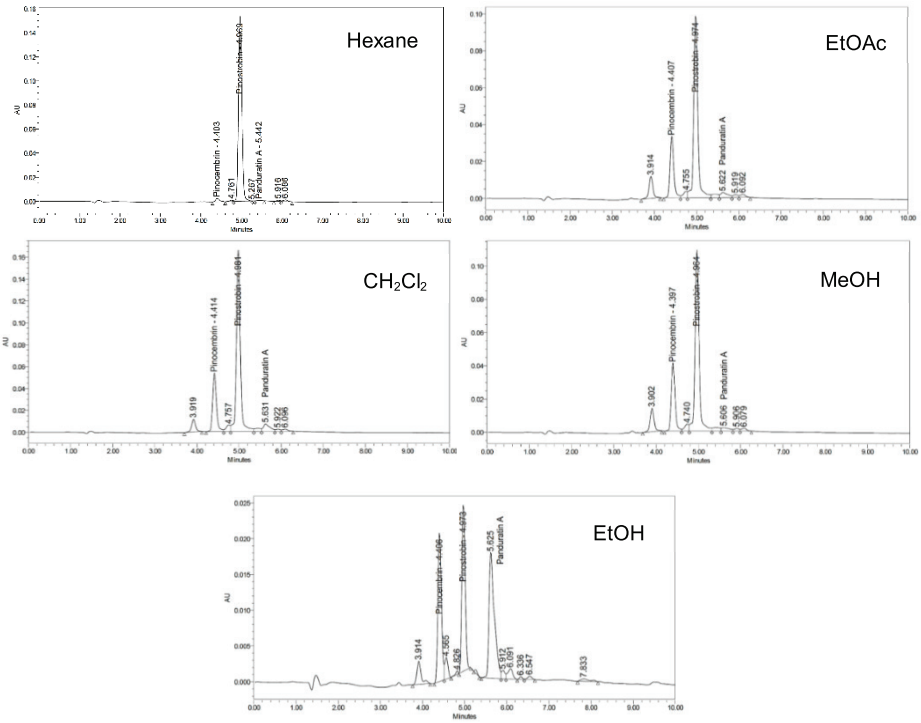


Figure 5 HPLC chromatograms of *Boesenbergia rotunda* extracts analyzed by a Poroshell HPH-C18 column (4.6 × 100 mm, 2.7 µm) with 0.1% phosphoric acid in water/acetonitrile as the mobile phase, at 0.8 mL/min and 290 nm.

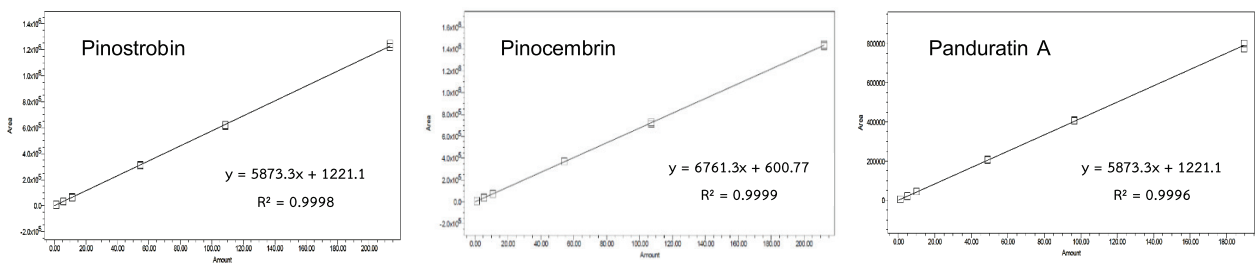


Figure 6 Standard calibration curves of pinostrobin, pinocembrin and panduratin A, all of which exhibit linear relationships between concentration and peak area.

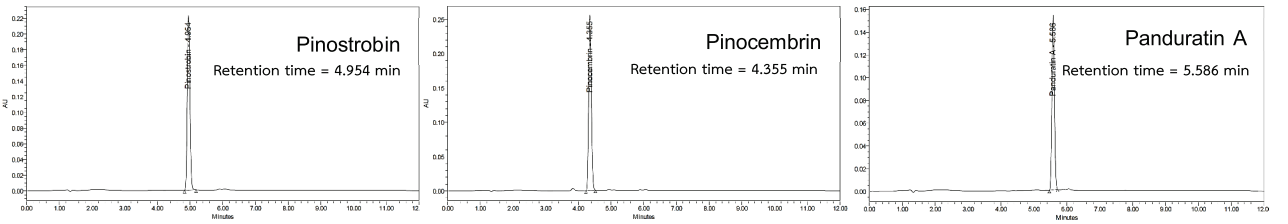


Figure 7 HPLC chromatograms of pinostrobin, pinocembrin and panduratin A standards, each at 100 µg/mL, analyzed by a Poroshell HPH-C18 column (4.6 × 100 mm, 2.7 µm) with 0.1% phosphoric acid in water and acetonitrile as the mobile phase, at a flow rate of 0.8 mL/min and detection at 290 nm.

SARS-CoV-2 ในหลอดทดลองจึงกำหนดให้เป็นหนึ่งในสารเป้าหมายหลักสำหรับการพัฒนาและทำบริสุทธิ์ เพื่อนำไปใช้ในการวิจัยระยะถัดไป [3] สารสกัดหยาบน้ำหนัก 535.5 กรัม คิดเป็นผลผลิตร้อยละ 10.71 ซึ่งใกล้เคียงกับผลผลิตในระดับห้องปฏิบัติการ สะท้อนว่าสภาวะการสกัดสามารถถ่ายทอดสู่ระดับขยายขนาดเบื้องต้นได้โดยไม่ทำให้ผลผลิตลดลงอย่างชัดเจน

สารสกัดหยาบน้ำหนัก 535.5 กรัม ตกผลึกด้วยเอทานอลให้ผลึกสีขาวของ pinostrobin 30.3 กรัม ส่วนสารสกัดที่เหลือน้ำหนัก 505.0 กรัม ถูกแยกด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบใช้สุญญากาศ และตรวจติดตามด้วย TLC ก่อนรวมเป็นส่วนแยกย่อย A_1–A_5 และส่วนแยกย่อย A_3 สามารถตกผลึกได้ pinostrobin เพิ่มเติม 41.17 กรัม ดังแสดงใน Figure 8 ซึ่งแสดงให้เห็นว่า pinostrobin สามารถแยกออกได้ตั้งแต่ช่วงต้นของกระบวนการด้วยการตกผลึกและการแยกส่วนตามความมีขั้ว ส่งผลให้ลดความซับซ้อนของสารสกัดก่อนเข้าสู่ขั้นตอนการทำบริสุทธิ์สารอื่น

ส่วนแยกย่อย A_3 ที่เหลือจากการตกผลึก (327.44 กรัม) ถูกนำไปแยกต่อด้วยคอลัมน์ซิลิกาเจลและ Sephadex LH-20 จนได้ส่วนแยกย่อย D_1–D_4 โดย D_2 ให้ panduratin A หลังการตกผลึกด้วยเอทานอล และ D_4 ให้ pinocembrin หลังการตกผลึกด้วยเมทานอล–ไดคลอโรมีเทน ดังแสดงใน Figure 9 ลำดับการแยกในแผนภาพแสดงให้เห็นว่าการใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟีหลายขั้นตอนร่วมกับ TLC และการตกผลึกสามารถแยกสารที่มีสมบัติทางเคมีใกล้เคียงกันออกจากกันได้อย่างเป็นระบบ

จากสารสกัดหยาบ 535.5 กรัม ได้ pinostrobin 71.47 กรัม pinocembrin 863.0 มิลลิกรัม และ panduratin A 2.18 กรัม คิดเป็นผลได้ร้อยละ 13.35, 0.16 และ 0.41 โดยน้ำหนักเมื่อเทียบกับสารสกัดหยาบเริ่มต้น ตามลำดับ เมื่อคำนวณเทียบกับวัตถุดิบแห้ง พบว่าได้สารทั้งสามชนิดประมาณ 14.29, 0.173 และ 0.436 มิลลิกรัมต่อกรัมวัตถุดิบแห้ง ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับ Adhikari et al. [16] ซึ่งสกัดเหง้ากระชายแห้ง 600 กรัมด้วยเมทานอล และนำสารสกัดบางส่วนไปแยกและทำบริสุทธิ์ พบว่าได้ pinostrobin 944.0 มิลลิกรัม pinocembrin 69.8 มิลลิกรัม และ panduratin A 116.4 มิลลิกรัม อย่างไรก็ตาม การเปรียบเทียบผลได้โดยตรงมีข้อจำกัด เนื่องจากปริมาณวัตถุดิบ ตัวทำละลาย และสัดส่วนของสารสกัดที่นำไปทำบริสุทธิ์แตกต่างกัน

3.4 การตรวจสอบและยืนยันโครงสร้างสารสำคัญ (Structural Verification of Compounds)

สารที่แยกได้ทั้งสามชนิดถูกตรวจสอบด้วยเทคนิค NMR spectroscopy โดยข้อมูลค่าการเลื่อนทางเคมี รูปแบบสัญญาณ และค่าคัปปลิงสอดคล้องกับรายงานก่อนหน้า [15-16] จึงสนับสนุนการระบุ

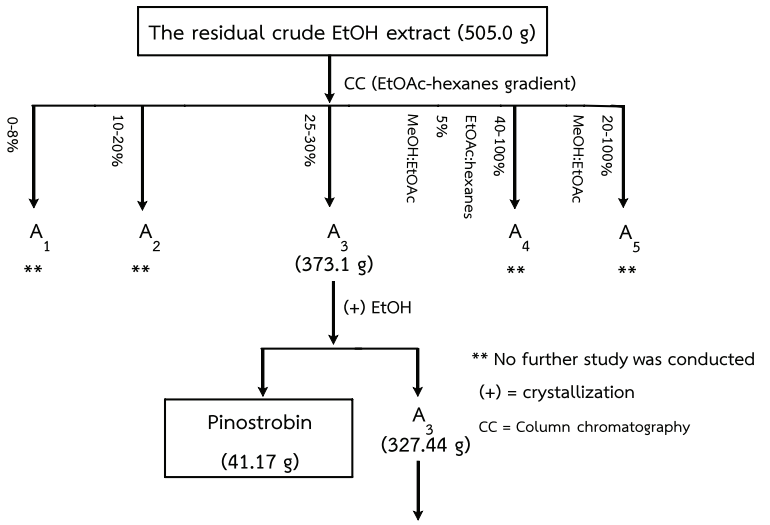


Figure 9

Figure 8 Isolation scheme of pinostrobin from the crude ethanol extract of *Boesenbergia rotunda*.

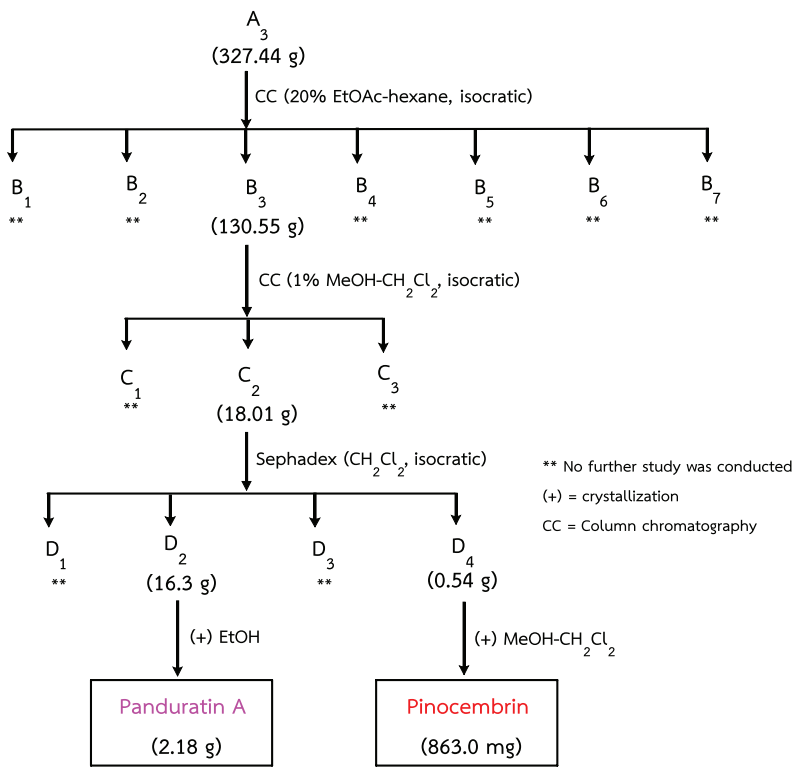


Figure 9 Isolation scheme of pinocembrin and panduratin A from subfraction A_3

เอกลักษณ์ของสารเป็น pinostrobin, pinocembrin และ panduratin A

Pinostrobin (**1**) was obtained as white crystals (71.47 g), ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): 11.95 (1H, *s*, 5-OH), 7.39-7.31 (5H, *m*, H-2', 3',4',5', 6'), 6.00 (1H, *d*, *J*=2.3 Hz, H-8), 5.99 (1H, *d*, *J*=2.3 Hz, H-6), 5.34 (1H, *dd*, *J*=3.0; 13.0 Hz, H-2), 3.73 (3H, *s*, 7-OCH_3), 3.01 (1H, *dd*, *J*=13.0; 17.2 Hz, H-3a), 2.74 (1H, *dd*, *J*=13.1; 17.2 Hz, H-3b). ^{13}C NMR (100 MHz in $CDCl_3$), δ_C ppm: 195.8 (C-4), 168.0 (C-7), 164.2 (C-5), 162.8 (C-8a), 138.1 (C-1'), 128.9 (C-3',5', 4'), 126.2 (C-2',6'), 103.2 (C-4a), 95.2 (C-8), 94.3 (C-6), 79.2 (C-2), 55.7 (7-OCH_3), and 43.4 (C-3).

Pinocembrin (**2**) was obtained as a white solid (863 mg), ^{1}H NMR (400 MHz, acetone-d_6): 12.16 (1H, *br*, *s*, 5-OH), 9.78 (1H, *br*, *s*, 7-OH), 7.47-7.38 (3H, *m*, H-3',4',5'), 7.57 (2H, *d*, *J*=7.3 Hz, H-2',6'), 6.00 (1H, *d*, *J*=2.1 Hz, H-8), 5.97 (1H, *d*, *J*=2.1 Hz, H-6), 5.58 (1H, *dd*, *J*=12.8; 3.0 Hz, H-2), 3.17 (1H, *dd*, *J*=17.1; 12.8 Hz, H-3a), and 2.81 (1H, *dd*, *J*=17.1; 12.8 Hz, H-3b). ^{13}C NMR (100 MHz in acetone d_6), δ_C ppm: 196.9 (C-4), 167.6 (C-7), 165.4 (C-5), 164.3 (C-8a), 140.1 (C-1'), 129.6 (C-3',5'), 129.5 (C-4'), 127.4 (C-2',6'), 103.3 (C-4a), 96.0 (C-8), 97.0 (C-6), 80.0 (C-2), and 43.7 (C-3).

Panduratin A (**3**) was obtained as yellow solid (2.18 g), ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): 7.24 (4H, *m*, H-2",3",5",6"), 7.14 (1H, *m*, H-4"), 5.90 (2H, *s*, H-3, 5), 5.46 (1H, *br*, *s*, H-4'), 4.90 (1H, *br*, *t*, *J*=6.0 Hz, H-8'), 4.71 (1H, *dd*, *J*=12, 4 Hz, H-1'), 3.76 (4-OCH_3), 3.46 (1H, *t*, *dd*, *J*=11.0, 6.0, 1.5 Hz, H-6'), 2.66 (1H, *br*, *q*, *J*=8 Hz, H-2'), 2.41 (1H, *m*, H-5'), 2.30 (1H, *dt*, *J*=16, 8 Hz, H-7'), 2.08 (1H, *m*, H-7'), 2.15 (1H, *m*, H-5'), 1.81 (3H, *s*, H-12'), 1.55 (6H, *s*, H-10',11'); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) , δ_C ppm: 206.6 (C-7), 165.1 (C-2,4,6), 147.0 (C-1"), 137.1 (C-3'), 131.9 (C-9'), 128.4 (C-3",5"), 127.1 (C-2",6"), 125.6 (C-4"), 124.2 (C-8'), 121.1 (C-4'), 105.9 (C-1), 94.5 (C-3,5), 55.4 (4-OCH_3), 53.9 (C-10), 42.7 (C-2'), 37.1 (C-6'), 35.9 (C-5'), 28.9 (C-7'), 25.7 (C-11'), 22.8 (C-12'), 18.0 (C-10').

ข้อมูล NMR ที่สำคัญดังกล่าวสอดคล้องกับโครงสร้างของสารอ้างอิงและผลการตรวจสอบด้วย TLC จึงยืนยันเอกลักษณ์ของสารที่แยกได้ทั้งสามชนิด ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่ากระบวนการที่พัฒนาขึ้นสามารถเชื่อมโยงการคัดเลือกตัวทำละลาย การสกัดระดับขยายขนาด และการทำบริสุทธิ์สารเป้าหมายได้อย่างเป็นระบบและมีศักยภาพสำหรับการประเมินความสามารถในการทำซ้ำและการขยายขนาดในอนาคต

4. วิจารณ์

ผลการศึกษาพบว่าชนิดของตัวทำละลายมีผลต่อทั้งผลผลิตสารสกัดและปริมาณสารเป้าหมายในเหง้ากระชายอย่างชัดเจน โดยเอทานอลให้ผลผลิตสารสกัดสูงที่สุดร้อยละ 11.81 ขณะที่เฮกเซนให้ผลผลิตต่ำที่สุดร้อยละ 5.03 แนวโน้มดังกล่าวสะท้อนว่าองค์ประกอบส่วนใหญ่ในเหง้ากระชายมีสมบัติที่ละลายได้ดีในตัวทำละลายมีขั้วปานกลางถึงสูง เอทานอลจึงสามารถสกัดสารหลายกลุ่มร่วมกันได้มากกว่าเฮกเซน ผลผลิตที่ได้ใกล้เคียงกับรายงานของ Salama et al. [6] ขณะที่ Fahrudin et al. [11] ยังแสดงให้เห็นว่าสัดส่วนเอทานอลและสภาวะกระบวนการมีผลต่อทั้งผลผลิตและองค์ประกอบของสารสกัด ความแตกต่างระหว่างการศึกษาอาจเกิดจากคุณภาพวัตถุดิบ การเตรียมตัวอย่าง อัตราส่วนตัวอย่างต่อตัวทำละลาย และประสิทธิภาพการถ่ายเทมวลระหว่างการสกัด อย่างไรก็ตาม ผลผลิตสารสกัดรวมที่สูงไม่ได้สัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณสารเป้าหมายทุกชนิด โดยไดคลอโรมีเทนให้ปริมาณ pinostrobin และ pinocembrin สูงที่สุด

ขณะที่เอทานอลให้ปริมาณ panduratin A สูงที่สุด ผลดังกล่าวแสดงว่าความสามารถในการสกัดขึ้นอยู่กับทั้งชนิดของตัวทำละลายและโครงสร้างของสาร รวมถึงความสามารถในการเกิดพันธะไฮโดรเจน การกระจายตัวระหว่างเมทริกซ์พืชกับตัวทำละลาย และการสกัดองค์ประกอบร่วม สารสกัดที่ให้ผลผลิตสูงอาจมีองค์ประกอบอื่นร่วมอยู่มาก จึงทำให้ความเข้มข้นของสารเป้าหมายต่อกรัมสารสกัดลดลง ขณะที่ตัวทำละลายบางชนิดอาจให้ผลผลิตรวมน้อยกว่าแต่มีความเหมาะสมสูงกว่า ซึ่งสอดคล้องกับงานของ Eiamart et al. [10] ที่พบว่าชนิดของตัวทำละลายเป็นปัจจัยสำคัญต่อการสกัด pinostrobin และ panduratin A จากกระชาย นอกจากนี้ Salama et al. [6] สามารถแยก panduratin A จากสารสกัดเอทานอลด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี จึงสนับสนุนว่าสารสกัดเอทานอลสามารถใช้เป็นวัตถุดิบตั้งต้นสำหรับการแยกสารชนิดนี้ได้

เอทานอลถูกเลือกสำหรับการขยายขนาด เนื่องจากให้ทั้งผลผลิตสารสกัดและปริมาณ panduratin A สูง อีกทั้งเหมาะต่อการดำเนินงานในระดับที่สูงขึ้นมากกว่าตัวทำละลายบางชนิด การสกัดผงกระชายแห้ง 5 กิโลกรัมด้วยเอทานอล 40 ลิตร ให้สารสกัดหยาบร้อยละ 10.71 ซึ่งใกล้เคียงกับผลในระดับห้องปฏิบัติการ แสดงว่าสัดส่วนวัตถุดิบต่อตัวทำละลายและสภาวะการสกัดยังคงรักษาประสิทธิภาพสำหรับการนำไปใช้ได้ในระดับขยายขนาดเบื้องต้น

กระบวนการแยกหลายขั้นตอนร่วมกับการตกผลึกสามารถให้สารเป้าหมายทั้งสามชนิดได้ โดย pinostrobin ให้ผลได้สูงที่สุด ซึ่งอาจสะท้อนถึงปริมาณที่มากกว่าในสารสกัดและความเหมาะสมต่อการตกผลึก ขณะที่ pinocembrin และ panduratin A ต้องผ่านขั้นตอนการแยกเพิ่มเติม เนื่องจากมีปริมาณต่ำกว่าและอาจมีองค์ประกอบร่วมที่มีสมบัติใกล้เคียงกัน เมื่อเปรียบเทียบกับรายงานของ Adhikari et al. [16] ซึ่งแยก pinostrobin, pinocembrin และ panduratin A จากสารสกัดเมทานอลได้ 944.0, 69.8 และ 116.4 มิลลิกรัม ตามลำดับ ปริมาณที่ได้จากการศึกษานี้อยู่ในระดับสูงกว่า อย่างไรก็ตาม การเปรียบเทียบดังกล่าวควรพิจารณาร่วมกับความแตกต่างของแหล่งวัตถุดิบ อายุเก็บเกี่ยว ชนิดและสัดส่วนตัวทำละลาย ตลอดจนเทคนิคการแยก จึงควรตีความเป็นความแตกต่างของกระบวนการมากกว่าการสรุปว่าวิธีใดมีประสิทธิภาพเหนือกว่าโดยตรง

5. สรุป

การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าการเลือกตัวทำละลายมีบทบาทสำคัญต่อทั้งผลผลิตสารสกัดและความเหมาะสมต่อ pinostrobin, pinocembrin และ panduratin A โดยตัวทำละลายที่ให้ผลผลิตสารสกัดรวมสูงอาจไม่เหมาะสมที่สุดสำหรับสารเป้าหมายทุกชนิด เอทานอลจึงถูกเลือกสำหรับการสกัดระดับขยายขนาด เนื่องจากให้ผลผลิตสารสกัดและปริมาณ panduratin A สูง พร้อมเอื้อต่อการแยกและทำบริสุทธิ์สารสำคัญในขั้นต่อไป

งานวิจัยนี้จึงเป็นการเชื่อมโยงการคัดเลือกตัวทำละลายในระดับห้องปฏิบัติการกับการขยายขนาดและการแยกสารเป้าหมายทั้งสามชนิดอย่างเป็นลำดับ จึงเป็นแนวทางการสกัดแบบมุ่งเป้าที่พิจารณาร่วมกันทั้งผลผลิต ความเหมาะสม และความเป็นไปได้ในการทำบริสุทธิ์ ผลการศึกษานี้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการพัฒนากระบวนการสกัดและแยกสารสำคัญจากกระชายให้มีประสิทธิภาพและเหมาะสมต่อการขยายขนาดในอนาคต โดยควรมีการประเมินความบริสุทธิ์ ความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ และความสามารถในการทำซ้ำของกระบวนการเพิ่มเติม

6. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณศาสตราจารย์เกียรติคุณ ดร.ปทุมรัตน์ ตู้จินดา ภาควิชาเคมี รองศาสตราจารย์ ดร.กัณยารัตน์ สุไพบูลย์วัฒน หัวหน้ากลุ่มสาขาวิชาชีวนวัตกรรมและผลิตภัณฑ์ฐานชีวภาพอัจฉริยะ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สิทธิวุฒิ เจริญสุทธิวรากุล ภาควิชาเภสัชวิทยา นางปิยานี รัตนชำนอง นักวิทยาศาสตร์ (ผู้เชี่ยวชาญ) ภาควิชาเภสัชวิทยา ที่ให้ความกรุณาช่วยอ่านและแนะนำบทความ และนางสาวสุขฤทัย วงศ์สุบิน นักวิทยาศาสตร์ หน่วยเครื่องมือกลาง งานวิจัยและนวัตกรรม คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล สำหรับความช่วยเหลือในการใช้เครื่อง HPLC รวมทั้งขอขอบพระคุณทีมผู้บริหารคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่มีนโยบายสนับสนุนโครงการพัฒนางานวิจัยจากงานประจำ

7. References

[1] Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health, 2018, Thai Herbal Pharmacopoeia 2018, Department of Medical Sciences, Nonthaburi, 808 p. (in Thai)

[2] Eng-Chong, T., Yean-Kee, L., Chin-Fei, C., Choon-Han, H., Sher-Ming, W., Li-Ping, C.T., Gen-Teck, F., Khalid, N., Abd Rahman, N., Karsani, S.A., Othman, S., Othman, R. and Yusof, R., 2012, *Boesenbergia rotunda*: From ethnomedicine to drug discovery, Evid. Based Complement. Altern. Med. 2012: 473637.

[3] Kanjanasirirat, P., Suksatu, A., Manopwisedjaroen, S., Munyoo, B., Tuchinda, P., Jearawuttanakul, K., Seemakhan, S., Charoensutthivarakul, S., Wongtrakoongate, P., Rangkasenee, N., Pitiporn, S., Waranuch, N., Chabang, N., Khemawoot, P., Chutipongtanate, S., Hongeng, S., Borwornpinyo, S. and Thitithanyanont, A., 2020, High-content screening of Thai medicinal plants reveals *Boesenbergia rotunda* extract and its component panduratin A as anti-SARS-CoV-2 agents, Sci. Rep. 10: 19963.

[4] Hidajati, N., Tukiran, T., Setiabudi, D.A. and Wardana, A.P., 2018, Antioxidant Activity of Palmitic Acid and Pinostrobin from Methanol Extract of *Syzygium littorale* (Myrtaceae), pp. 183-187, In Proceedings of the International Conference on Science and Technology (ICST 2018), Atlantis Press.

[5] Lan, X., Wang, W., Li, Q. and Wang, J., 2016, The natural flavonoid pinocembrin: Molecular targets and potential therapeutic applications, Mol. Neurobiol. 53(3): 1794-1801.

[6] Salama, S.M., AlRashdi, A.S., Abdulla, M.A., Hassandarvish, P. and Bilgen, M., 2013, Protective activity of panduratin A against thioacetamide-induced oxidative damage: Demonstration with in vitro experiments using WRL-68 liver cell line, BMC Complement. Altern. Med. 13: 279.

[7] Yun, J.M., Kwon, H. and Hwang, J.K., 2003, In vitro anti-inflammatory activity of panduratin A isolated from *Kaempferia pandurata* in RAW264.7 cells, Planta Med. 69(12): 1102-1108.

[8] Mazzotta, S., Governa, P., Borgonetti, V., Marcolongo, P., Nanni, C. and Gamberucci, A., 2021, Pinocembrin and its linolenoyl ester derivative induce wound-healing activity in HaCaT cell line potentially involving a GPR120/FFA4-mediated pathway, Bioorg. Chem. 108: 104657.

[9] Ruttanapattanakul, J., Wikan, N., Potikanond, S. and Nimlamool, W., 2022, Molecular targets of pinocembrin underlying its regenerative activities in human keratinocytes, Pharmaceuticals 15(8): 954.

[10] Eiamart, W., Wittayalertpanya, S., Tadtong, S. and Samee, W., 2024, Efficient simultaneous isolation of pinostrobin and panduratin A from *Boesenbergia rotunda* using centrifugal partition chromatography, Molecules 29: 5186.

[11] Fahrudin, F.I., Phongthai, S., Wirjantoro, T.I. and Intipunya, P., 2025, Synergistic effects of pressure, temperature, CO_2 flow rate and co-solvent on bioactive contents of Thai fingerroot [*Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf.] extracts, Foods 14: 2189.

[12] Metheenukul, T., Aimjongjun, S., Aoonboontum, P., Saesue, K., Rungsang, T., Matwangsang, S., Metheenukul, P., Rikakorn, A., Fakhrudin, N., Khorana, N. and Srivilai, J., 2026, Pulse electric field-assisted extraction of pinostrobin and panduratin A from *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf. and biological assessment on antioxidation and glucose uptake inhibition, Curr. Tradit. Med. 12: e22150838368902.

[13] Polsan, N., Wachisunthon, D., Ontong, S. and Poonsatha, S., 2025, Effect of *Boesenbergia rotunda* ethanolic extract on CYP3A4, CYP2C9 and CYP2E1 activities, J. Thai Tradit. Altern. Med. 23(2): 289-300. (in Thai)

[14] Techapichetvanich, P., Khemawoot, P., Srimangkornkaew, P., Munyoo, B., Tuchinda, P., Hongeng, S. and Vivithanaporn, P., 2024, Sub-acute toxicity of the standardised extract of *Boesenbergia rotunda* in rats, ScienceAsia 50(3): 2024057.

[15] Tanjung, M., Tjahjandarie, T.S. and Sentosa, M.H., 2013, Antioxidant and cytotoxic agent from the rhizomes of *Kaempferia pandurata*, Asian Pac. J. Trop. Dis. 3(5): 401-404.

[16] Adhikari, D., Gong, D.S., Oh, S.H., Sung, E.H., Lee, S.O., Kim, D.W., Oak, M.H. and Kim, H.J., 2020, Vasorelaxant effect of *Boesenbergia rotunda* and its active ingredients on an isolated coronary artery, Plants 9(12): 1688.